

肾透明细胞癌中核蛋白 1 对阿昔替尼耐药的作用及机制

刘耘充, 吴宗龙, 葛力源, 杜 坦, 吴雅倩, 宋一萌, 刘 承[△], 马潞林[△]

(北京大学第三医院泌尿外科, 北京 100191)

[摘 要] **目的:**寻找肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)对阿昔替尼耐药的潜在机制,以期拓展对阿昔替尼耐药的理解,便于设计更有针对性的治疗方案,提高患者的治疗效果及生存预后。**方法:**通过摸索阿昔替尼对 ccRCC 细胞系 786-O 与 Caki-1 的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀),使用此浓度下的阿昔替尼体外反复刺激细胞 30 个周期,构建对阿昔替尼耐药的细胞系,未被阿昔替尼处理过的细胞系为敏感细胞系,检测耐药细胞系及敏感细胞系在细胞增殖、细胞凋亡水平上的表型差异。通过转录组测序,在两耐药细胞系共同上调表达的差异基因内筛选出可能参与耐药过程的基因,通过实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)及蛋白质免疫印迹(Western blot, WB)验证耐药细胞系中靶基因的表达量。在基因表达谱交互分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)数据库中分析靶基因在 ccRCC 肿瘤及瘤旁组织的表达差异,在 Kaplan-Meier 绘图(Kaplan-Meier Plotter, K-M Plotter)数据库中分析靶基因对 ccRCC 患者的预后影响。对耐药细胞系的靶基因使用慢病毒载体的核糖核酸干扰进行敲低后,再次检测细胞表型差异。使用 WB 检测不同处理细胞系的细胞凋亡相关蛋白的水平,寻找可能导致耐药的分子通路。**结果:**体外成功构建出对阿昔替尼耐药的 ccRCC 细胞系 786-O-R 与 Caki-1-R,其较敏感细胞系的 IC₅₀显著升高(分别高出 10.99 μmol/L, $P < 0.01$; 11.96 μmol/L, $P < 0.01$)。细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)、集落形成、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)实验结果显示耐药细胞系的增殖能力较敏感细胞系下降,但凋亡染色结果显示耐药细胞系的细胞凋亡水平显著降低($P < 0.01$)。尽管对阿昔替尼耐药,但耐药细胞系在 20 μmol/L 阿昔替尼环境中无明显的新生肿瘤细胞产生。转录组测序筛选出核蛋白 1(nuclear protein 1, NUPR1)基因,其核糖核酸($P < 0.0001$)及蛋白表达水平在耐药细胞系中显著上升。GEPIA 数据库分析结果显示 NUPR1 在 ccRCC 肿瘤组织中显著高表达($P < 0.05$);NUPR1 高表达的 ccRCC 患者生存预后更差($P < 0.001$)。细胞凋亡染色结果显示,敲低 NUPR1 后抑制了各耐药细胞系对阿昔替尼的抗凋亡能力(786-O, $P < 0.01$; Caki-1, $P < 0.05$)。WB 结果显示,敲低 NUPR1,被阿昔替尼处理后耐药细胞系的 B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, BCL2)蛋白水平下降,BCL2 相关 X 蛋白(BCL2-associated X protein, BAX)水平增加,前体 caspase3 蛋白表达水平下降,剪切体 c-caspase3 水平上升。**结论:**ccRCC 细胞系通过 NUPR1-BAX/BCL2-caspase3 通路减少细胞凋亡,参与了对阿昔替尼的耐药过程。

[关键词] 肾透明细胞癌;阿昔替尼;核蛋白 1;细胞凋亡;药物抵抗

[中图分类号] R737.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2023)05-0781-12

doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2023.05.003

Mechanism of nuclear protein 1 in the resistance to axitinib in clear cell renal cell carcinoma

LIU Yun-chong, WU Zong-long, GE Li-yuan, DU Tan, WU Ya-qian, SONG Yi-meng, LIU Cheng[△], MA Lu-lin[△]
(Department of Urology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

ABSTRACT Objective: To explore the potential mechanism of resistance to axitinib in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), with a view to expanding the understanding of axitinib resistance, facilitating the design of more specific treatment options, and improving the treatment effectiveness and survival prognosis of patients. **Methods:** By exploring the half maximum inhibitory concentration (IC₅₀) of axitinib on ccRCC cell lines 786-O and Caki-1, cell lines resistant to axitinib were constructed by repeatedly stimulated with axitinib at this concentration for 30 cycles *in vitro*. Cell lines that were not treated by axitinib were sensitive cell lines. The phenotypic differences of cell proliferation and apoptosis levels between drug resistant and sensitive lines were tested. Genes that might be involved in the drug resistance process were screened from the differentially expressed genes that were co-upregulated in the two drug resistant

基金项目: 国家自然科学基金(81972381) Supported by the National Natural Science Foundation of China (81972381)

△ Corresponding author's e-mail, chengliumd@163.com, malulinpk@163.com

网络出版时间:2023-08-25 10:47:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20230824.1429.006.html>

lines by transcriptome sequencing. The expression level of the target gene in the drug resistant lines was verified by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot (WB). The expression differences of the target gene in ccRCC tumor tissues and adjacent tissues were analyzed in the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) public database, and the impact of the target gene on the prognosis of ccRCC patients was analyzed in the Kaplan-Meier Plotter (K-M Plotter) database. After knocking down the target gene in the drug resistant lines using RNA interference by lentivirus vector, the phenotypic differences of the cell lines were tested again. WB was used to detect the levels of apoptosis-related proteins in the different treated cell lines to find molecular pathways that might lead to drug resistance. **Results:** Cell lines 786-O-R and Caki-1-R resistant to axitinib were successfully constructed *in vitro*, and their IC_{50} were significantly higher than those of the sensitive cell lines (10.99 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$; 11.96 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$, respectively). Cell counting kit-8 (CCK-8) assay, colony formation, and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assay showed that compared with the sensitive lines, the proliferative ability of the resistant lines decreased, but apoptosis staining showed a significant decrease in the level of cell apoptosis of the resistant lines ($P < 0.01$). Although resistant to axitinib, the resistant lines had no obvious new replicated cells in the environment of 20 $\mu\text{mol/L}$ axitinib. Nuclear protein 1 (*NUPRI*) gene was screened by transcriptome sequencing, and its RNA ($P < 0.0001$) and protein expression levels significantly increased in the resistant lines. Database analysis showed that *NUPRI* was significantly overexpressed in ccRCC tumor tissue ($P < 0.05$); the ccRCC patients with higher expression of *NUPRI* had a worse survival prognosis ($P < 0.001$). Apoptosis staining results showed that knockdown of *NUPRI* inhibited the anti-apoptotic ability of the resistant lines to axitinib (786-O, $P < 0.01$; Caki-1, $P < 0.05$). WB results showed that knocking down *NUPRI* decreased the protein level of B-cell lymphoma-2 (*BCL2*), increased the protein level of *BCL2*-associated X protein (*BAX*), decreased the protein level of pro-caspase3, and increased the level of cleaved-caspase3 in the resistant lines after being treated with axitinib. **Conclusion:** ccRCC cell lines reduce apoptosis through the *NUPRI*-*BAX/BCL2*-caspase3 pathway, which is involved in the process of resistance to axitinib. **KEY WORDS** Clear cell renal cell carcinoma; Axitinib; Nuclear protein 1; Apoptosis; Drug resistance

肾癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率在全球范围内呈上升趋势。据统计,全球每年有超过 30 万余新发病例,14 万余死于肾癌相关疾病^[1]。肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 是最常见的肾癌类型,但 30% 的 RCC 患者在最初确诊时便发生远处转移^[2],且 20% ~ 30% 的局限性 RCC 患者在肾切除术后仍会复发^[3]。

靶向血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI), 以及 TKI 与免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 的联合应用已大大提高患者们的生存预后^[4-5]。作为第二代 VEGF 类 TKI 的阿昔替尼相较于第一代 TKI 有其独特优势,阿昔替尼对血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 靶点更具特异性,相比第一代 TKI 不良反应少^[6],且易于耐受,使得阿昔替尼治疗窗口更广^[7]。阿昔替尼的半衰期更短,在新辅助治疗的研究中停药 3 d 即可进行手术而不增加切口出血风险,而舒尼替尼与索拉非尼需要停药 3 到 4 周才可进行手术^[8]。对中国 RCC 患者应用 TKI 行新辅助治疗的研究^[8]表明,阿昔替尼 (减少 1.5 cm) 相比舒尼替尼 (减少 0.8 cm, $P = 0.001$) 和索拉非尼 (减少 0.5 cm, $P < 0.001$) 可显著减少肿瘤的中位最大直径值,说明阿昔替尼相比第一代 TKI 在 RCC 的新辅助治疗中具有优势。

随着转移性 RCC 靶向与免疫联合治疗时代的到来,VEGF 类 TKI 仍然是不可缺少的成分,因为 VEGF 可以诱导免疫监测细胞的抑制,诱导髓系衍生抑制细胞的扩增,进而抑制细胞毒性的肿瘤浸润淋巴细胞,干扰树突状细胞的成熟^[9],因此,抗 VEGF 药物有助于 ICI 发挥抗肿瘤效用。在联合用药方面,阿昔替尼与帕博利珠单抗或阿维鲁单抗的联用已成为晚期 RCC 患者的一线药物治疗方案^[4,10-11]。

然而,绝大多数接受药物治疗的患者最终都将面临肿瘤耐药的问题:一线抗 VEGF 药物治疗的无进展生存期仅为 11 个月左右,持久的完全反应少见^[12-13];10.9% 接受帕博利珠单抗联用阿昔替尼治疗的 RCC 患者在首次反应评估时便显示疾病进展,44.1% 的患者在开始治疗后一年内即出现疾病进展^[4,14]。目前已有大量文献阐述 RCC 对 VEGF 类 TKI 耐药的可能机制,但绝大部分都是针对第一代 VEGF 类 TKI (如舒尼替尼、索拉非尼等药物) 的研究^[15],鲜有关于对 RCC 阿昔替尼耐药机制的研究。

基于阿昔替尼在 RCC 治疗中起到的优势作用,以及对阿昔替尼耐药机制研究的缺乏,研究 RCC 对阿昔替尼产生耐药性的可能机制具有一定意义。本研究通过体外构建出对阿昔替尼耐药的肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 细胞系,通过转录组测序,在耐药细胞系上调表达的差异基因中选出了核蛋白 1 (nuclear protein 1, *NUPRI*) 这

一转录调节因子,探索其在 ccRCC 对阿昔替尼耐药性形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验对象

本研究所涉及实验均为细胞实验,所用人 ccRCC 细胞系 786-O 与 Caki-1 均由北京大学第三医院中心实验室赠予。

1.2 细胞培养

本实验所使用的培养基为含有 10% (体积分数) 胎牛血清 (C04001, 上海 Vivacell 公司) 的洛斯基·帕克纪念研究所 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, RPMI-1640, C11875500BT, Gibco 公司, 美国) 完全培养基。细胞培养箱条件设置: 温度为 37 °C, CO₂ 浓度为 5% (体积分数)。细胞长到 80% ~ 90% 汇合度时进行传代, 平均每 3 ~ 5 天传代一次。

1.3 细胞增殖实验

细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 实验: 将悬浮在完全培养基中的细胞以每孔 1 000 个细胞的密度接种到 96 孔板中, 并在细胞附着后用阿昔替尼 (AG013736, 上海蓝木公司) 或二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, PYG0040, 武汉博士德生物公司) 处理。使用 CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒 (CA1210, 北京索莱宝公司), 按说明书测定 ccRCC 细胞的活力, 使用酶标仪测量各孔在 450 nm 处的光密度 (*D*) 值, 每种处理的细胞行 5 个重复孔, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行绘图。

集落形成实验: 将悬浮在完全培养基中的细胞以每孔 500 个细胞的密度接种到 6 孔板中, 并在细胞附着后用阿昔替尼或 DMSO 处理。2 周后, 使用 ImageJ 软件的自动细胞计数功能计算细胞数 > 50 的集落数量, 该实验重复 3 次且相互独立。

5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 实验: 按照 EdU 细胞增殖检测试剂盒 (CA1170, 北京索莱宝公司) 说明, 向 24 孔板内的细胞加入 EdU 溶液并孵育 2 h, 然后用 4% (体积分数) 多聚甲醛固定。在该过程之后, 用试剂盒内 Hoechst 和 Apollo 溶液对细胞进行染色后于倒置荧光显微镜下拍照, 使用 ImageJ 的自动细胞计数功能对不同荧光下的细胞进行计数, 使用 GraphPad Prism 8.0 对数据进行检验及绘图, 每种处理的细胞行 3 个重复孔。

1.4 细胞凋亡染色

使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒

(C1062L, 上海碧云天公司) 测量细胞凋亡率。将悬浮在完全培养基中的细胞以每孔 25 000 个细胞的密度接种到 48 孔板中放入细胞培养箱培养。待细胞汇合度达 30% ~ 40% 水平后, 每孔加入 1 mL 含有终浓度为 20 μmol/L 阿昔替尼或对应体积 DMSO 的完全培养基, 放入细胞培养箱。药物处理 48 h 后按说明书提示进行染色, 随即在荧光显微镜下观察, 未被荧光染色的为正常细胞, 仅被绿色荧光染色的是早期凋亡细胞, 被绿色和红色荧光双染的是晚期凋亡细胞, 仅被红色荧光染色的是机械性坏死细胞。使用 ImageJ 的自动细胞计数功能对不同荧光下的细胞进行计数, 使用 GraphPad Prism 8.0 对数据进行检验及绘图, 每种处理的细胞行 3 个重复孔。

1.5 耐药细胞系的构建

对于体外模型, 药物敏感的 ccRCC 细胞暴露于恒定高浓度或逐渐增加浓度的药物 20 ~ 30 代之后可获得特异性的耐药性^[16]。阿昔替尼使用 DMSO 溶剂溶解, 未被阿昔替尼处理的细胞系为敏感细胞系, 分别表示为 786-O-S 与 Caki-1-S。使用含有终浓度分别为 0 (仅含少量 DMSO 溶剂, 不含阿昔替尼)、5、10、20、40、100 μmol/L 阿昔替尼的完全培养基来处理敏感细胞系 48 h, 通过 CCK-8 实验测出用上述浓度阿昔替尼处理的各敏感细胞系的细胞活力值, 进一步得出各敏感细胞系对阿昔替尼的 IC₅₀。将现用现配、含有终浓度为 IC₅₀ 浓度阿昔替尼的完全培养基, 加入细胞生长至 50% 汇合度的 T25 培养瓶中, 培养细胞 3 ~ 5 d 后, 更换为不含阿昔替尼的完全培养基培养细胞 3 ~ 5 d, 构成一个暴露周期。细胞对阿昔替尼的暴露时间会根据细胞的耐受性及细胞状态进行调整, 期间对细胞进行正常传代培养。维持阿昔替尼的暴露至少 30 个周期后, 对此细胞系再次评估 IC₅₀, 得到的耐药细胞系进行后续实验。对阿昔替尼耐药的细胞系分别表示为 786-O-R 与 Caki-1-R。

1.6 实时荧光定量聚合酶链式反应

使用核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 提取试剂 TRIzol (15596018, Thermo Fisher 公司, 美国) 按常规方案提取细胞中的总 RNA 后, 按照说明书配制 20 μL 反转录体系进行反转录后进行实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)。本研究采用上海翌圣生物公司的 qPCR SYBR Green Master Mix 预混液, 内参照基因为 β -actin, 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 RNA 的相对表达量。所用引物序列如下, β -actin 正向序列: 5'-CCACGAACTACCTTCAACTCC-3'; 反向序列: 5'-

CTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3'。NUPRI 正向序列: 5'-ACCTTCCCACCAGCAACC-3'; 反向序列: 5'-AATGGGCCAGGCTATAGAGG-3'。

1.7 慢病毒 shRNA 介导的 NUPRI 敲低

慢病毒的构建由上海吉凯基因化学技术有限公司完成。根据文献[17]构建靶向 NUPRI 的 shRNA 序列: 5'-CCGGGATGAATCTGACCTCTATAGCTCG-AGCTATAGAGGTCAGATTCATCTTTTTT-3'; 无义序列: 5'-CCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAG-AACGTGACACGTTCCGAGAATT-TTTG-3'。将序列插入慢病毒载体 (hU6-MCS-CMV-Puro), 之后用浓缩的病毒转染细胞, 并持续两周用嘌呤霉素 (ST551, 上海碧云天公司) 筛选稳定的细胞克隆。将用于敲低 NUPRI 的细胞系分为实验组 (sh-NUPRI) 与对照组 (sh-NC)。

1.8 蛋白质免疫印迹实验

使用细胞裂解液 (R0010, 北京索莱宝公司) 提取细胞总蛋白, 使用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度。电泳时每样本孔内加入 20 μg 总蛋白, 按目的蛋白大小的不同, 使用 8% ~ 12% (体积分数) 的分离胶和 5% (体积分数) 的浓缩胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后使用恒流 200 mA、50 min 条件将蛋白转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。转膜完成后将 PVDF 膜置入 5% (质量分数) 脱脂奶粉封闭液中于室温下摇床上封闭 2 h。封闭完成后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育 β -actin 一抗 (TA-09, 北京中杉金桥公司)、NUPRI 一抗 (15056-1-AP, Proteintech 公司, 美国)、B 细胞淋巴瘤 (B-cell lymphoma-2, BCL2) 一抗 (26593-1-AP, Proteintech 公司, 美国)、BCL2 相关 X 蛋白 (BCL2-associated X protein, BAX) 一抗 (50599-2-Ig, Proteintech 公司, 美国)、caspase3 一抗 (19677-1-AP, Proteintech 公司, 美国)。次日将膜使用含吐温-20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液 (tris buffered saline with Tween 20, TBST, T1081, 北京索莱宝公司) 漂洗后置入辣根酶标记山羊抗兔 IgG 二抗 (ZB-2301, 北京中杉金桥公司) 或辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 二抗 (ZB-2305, 北京中杉金桥公司) 中室温孵育 1 h 后, 使用电化学发光法显色, 置入化学发光成像仪中采集图像并保存。

1.9 用公共数据库分析基因表达差异及与预后的关系

进入基因表达谱交互分析 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA) 网站 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>), 在“Single Gene Analysis”选

框中点击“Boxplots”, 输入目的基因, 选取“KIRC”数据后, 将肿瘤与瘤旁组织间的表达差异基因进行绘图。

进入卡普兰-梅尔绘图 (Kaplan-Meier Plotter, K-M Plotter) 网站 (<https://kmplot.com/analysis/>), 点击“mRNA”内容中的“pan-cancer”, 在新页面的“Gene symbol”框内输入目的基因, 下方肿瘤类别中仅勾选“Kidney renal clear cell carcinoma ($n = 530$)”, 点击“Draw Kaplan-Meier plot”得到生存曲线与对应基因及病种的绘图。

1.10 转录组测序

对细胞系的转录组测序由深圳裕策生物科技有限公司完成, 每种细胞系具有 3 个重复样本, 共 12 个样本得到测序。

1.11 统计学分析

数据处理采用 GraphPad Prism 8.0 软件。对满足正态分布的连续数据以均数 \pm 标准差表示, 用 Student's t 检验方法对实验组与对照组间的差异进行验证, 多个实验组数据 (小于 5 组) 之间两两比较的差异采用 One Way ANOVA 检验, 并选用 Bonferroni 方法进行事后两两分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 阿昔替尼耐药细胞系的构建验证

通过 CCK-8 实验测出阿昔替尼对 786-O-S 与 Caki-1-S 细胞系的 IC_{50} 分别为 21.75、18.76 $\mu\text{mol/L}$, 因此, 选用含有终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 阿昔替尼的完全培养基, 处理 786-O-S 与 Caki-1-S 细胞系 30 余个药物暴露周期。通过测算两个被长期药物处理细胞系的 IC_{50} , 发现其较敏感细胞系各自高出 10.99 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$) 和 11.96 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$), 从而得到了对阿昔替尼耐药的细胞系 786-O-R 与 Caki-1-R (图 1)。

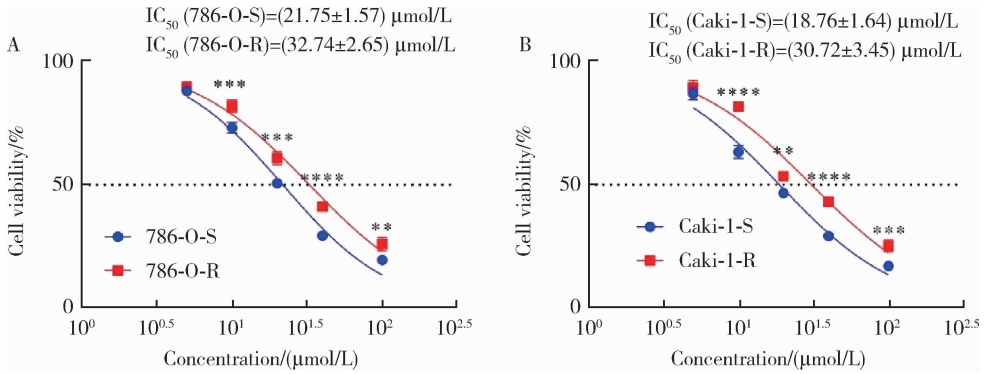
为防止构建出的耐药细胞系对阿昔替尼恢复敏感性, 我们对构建的耐药细胞系持续维持着阿昔替尼的周期性暴露。

2.2 阿昔替尼耐药与敏感的细胞系存在表型差异

为了寻找耐药细胞 IC_{50} 水平升高的原因, 我们进而通过 CCK-8 实验 (图 2)、平板克隆实验 (图 3) 与 EdU 实验 (图 4) 首先探究了细胞增殖能力, 结果发现, 在无阿昔替尼的环境中, 耐药细胞系的增殖能力较敏感细胞系有所下降; 而在有阿昔替尼的环境中, 尽管 CCK-8 实验显示耐药细胞系增殖能力强于敏感细胞系 ($P < 0.05$), 但在平板克隆实验与 EdU

实验中显示两组细胞的增殖能力差异无统计学意义,因此,我们考虑耐药细胞系的 IC_{50} 较敏感细胞系升高的原因不是通过影响 ccRCC 细胞增殖实现的,可能是抗凋亡能力增强的结果。之后通过细胞凋亡染色评估了各细胞系在不同处理下的凋亡水平(图5),结果发现,在没有阿昔替尼处理的环境中,两细胞无自发凋亡情况;在 $20 \mu\text{mol/L}$ 阿昔替尼存在的

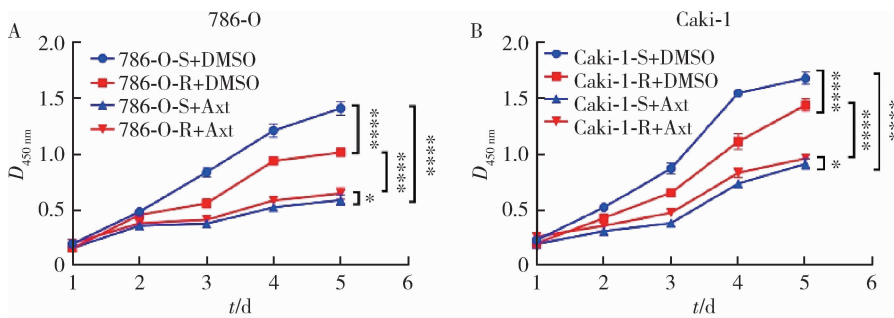
环境下,两细胞系中敏感细胞系的凋亡水平显著高于耐药细胞系 ($P < 0.01$)。这种在无药物环境下可以缓慢增殖、在暴露于药物时凋亡水平减少的特点,导致经阿昔替尼处理的耐药细胞系的 IC_{50} 水平升高。为了寻找是何种因素使耐药细胞系的抗凋亡能力增强,我们接下来对各细胞系进行了转录组测序。



A, cell viability of axitinib resistant and sensitive lines of 786-O; B, cell viability of axitinib resistant and sensitive lines of Caki-1. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

图1 不同细胞系的 IC_{50}

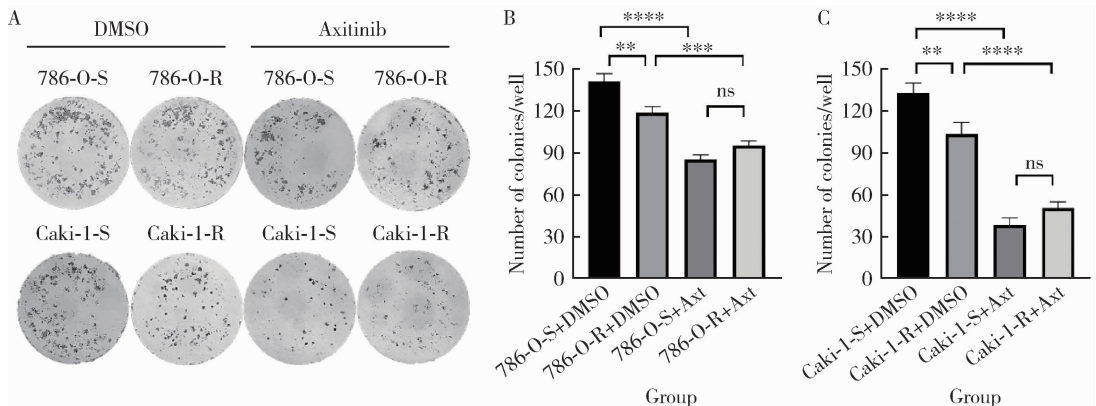
Figure 1 IC_{50} of different cell lines



A, CCK-8 assay of 786-O cell lines; B, CCK-8 assay of Caki-1 cell lines. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$. CCK-8, cell counting kit-8; DMSO, dimethyl sulfoxide; Axt, axitinib.

图2 不同细胞系的 CCK-8 结果

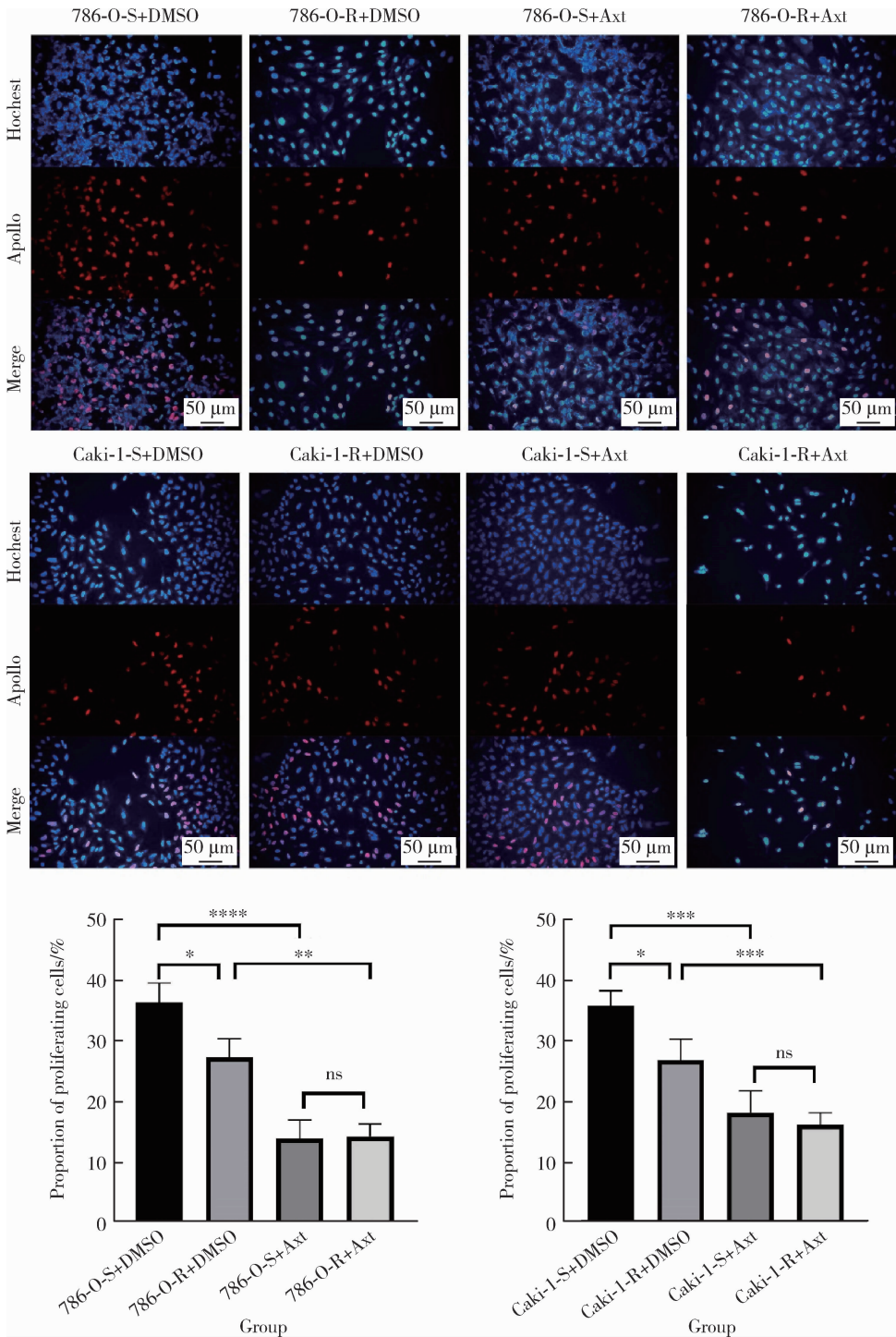
Figure 2 CCK-8 assay of different cell lines



The colony formation ability of the resistant lines was weaker than that of the sensitive lines in the plate cloning experiment in the drug-free environment. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; ns, no significance. DMSO, dimethyl sulfoxide; Axt, axitinib.

图3 不同细胞系的集落形成实验结果

Figure 3 Colony formation assay of different cell lines



In the EdU assay, the proliferation ability of the resistant lines was weaker than that of the sensitive line in the drug-free environment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; ns, no significance. DMSO, dimethyl sulfoxide; Axt, axitinib.

图 4 不同细胞系的 EdU 实验结果

Figure 4 EdU assay of different cell lines

2.3 NUPRI 基因的筛选及表达水平验证

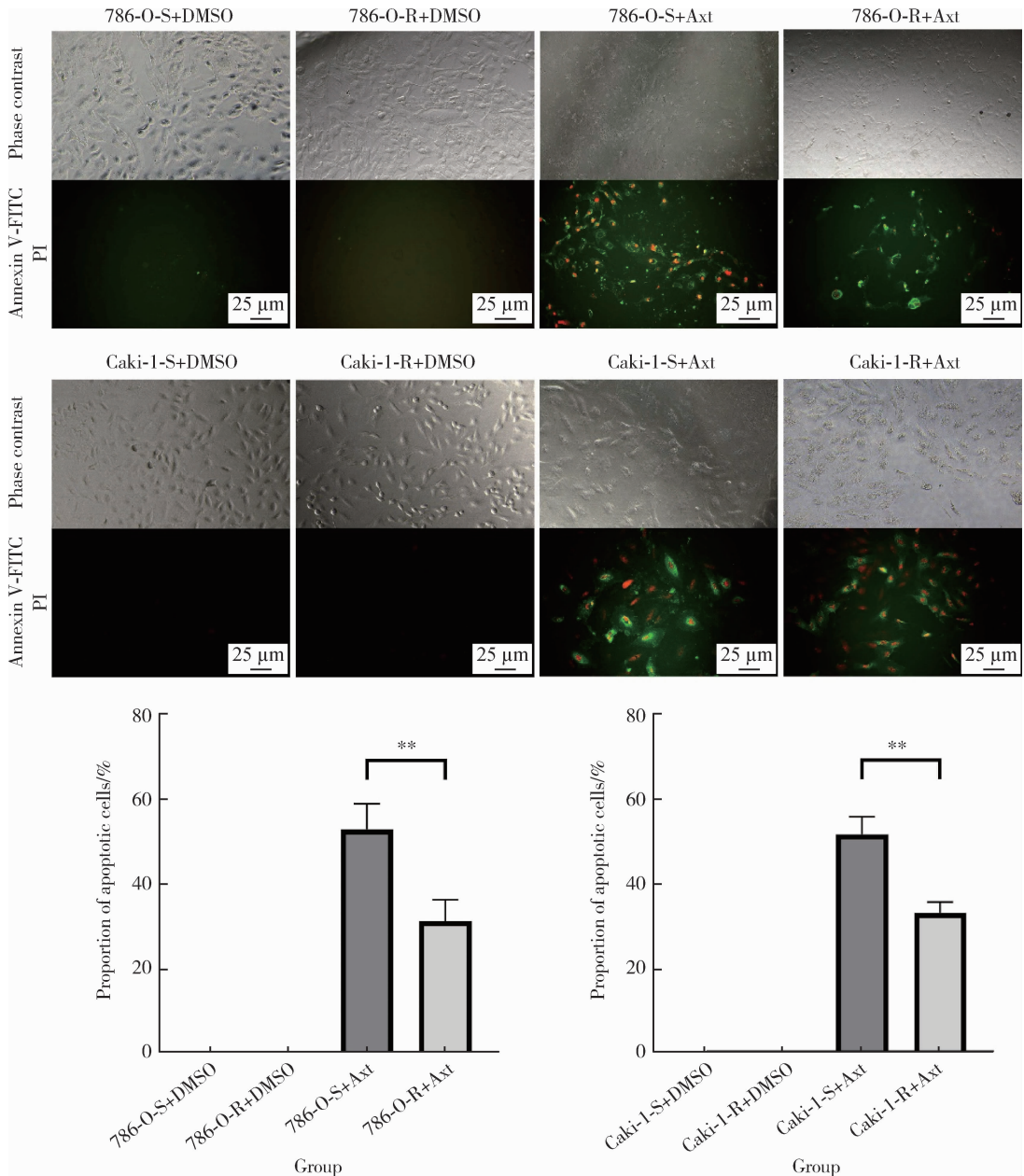
对耐药及敏感的 786-O、Caki-1 细胞系进行全转录组测序,以期找到令耐药细胞系抗凋亡能力增强的基因。在每个细胞系中,以敏感细胞系为对照组,在得到的差异基因中,以 $\log_2(\text{FoldChange}) > 1$ 和 $q < 0.05$ 为过滤阈值筛选出上调表达的差异基

因,结果得到了 288 个在两耐药细胞系中共同上调表达的差异基因。此外,对差异基因在 Hallmark 通路中进行富集分析,发现耐药细胞系较敏感细胞系的凋亡通路相关基因表达有所下调。

在上调表达的 288 个差异基因中,有研究报道了 NUPRI 的敲低逆转了 ccRCC 对索拉非尼的耐药

性,且其他研究有报道 *NUPRI* 参与了细胞凋亡的过程,因此,我们接下来针对 *NUPRI* 基因开展实验,探究其在对阿昔替尼耐药细胞系中是否具有抗凋亡的作用。此外,通过 GEPIA 网站的数据分析,发现

*NUPRI*在 ccRCC 肿瘤组织中 RNA 含量较瘤旁组织更高($P < 0.05$);K-M Plotter 数据库分析结果显示在 ccRCC 患者中,*NUPRI* 的高表达使患者预后更差(风险比 = 1.66,95% CI:1.23 ~ 2.24, $P = 0.00076$)。



In the apoptosis staining assay, the apoptosis level of resistant lines was significantly lower than that of sensitive lines in the presence of axitinib (** $P < 0.01$). PI, propidium iodide; FITC, fluorescein isothiocyanate; DMSO, dimethyl sulfoxide; Axt, axitinib.

图5 不同细胞系的凋亡染色实验结果

Figure 5 Apoptosis staining assay of different cell lines

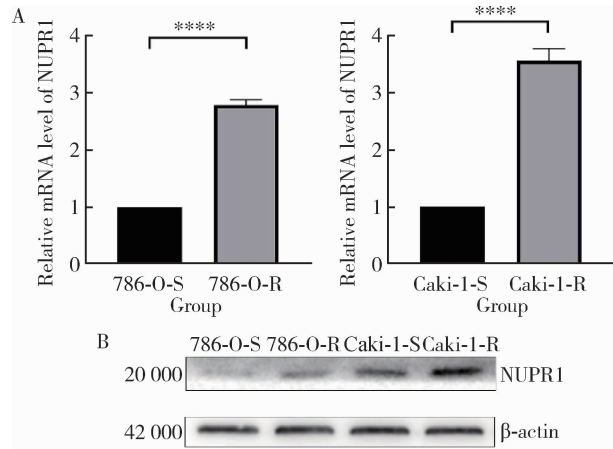
我们接下来从 RNA 及蛋白表达水平对 *NUPRI* 基因在耐药细胞系中的表达进行了验证,结果发现在 RNA 水平上,786-O 与 Caki-1 耐药细胞系较敏感细胞系的 *NUPRI* 转录水平均显著升高($P < 0.0001$,图 6A),蛋白表达水平得到了同样的结果(图 6B)。

2.4 敲低 *NUPRI* 可使对阿昔替尼耐药的细胞系恢

复敏感

使用慢病毒转染各细胞系后,通过 WB 实验验证各细胞系 *NUPRI* 的敲低效果(图 7),结果证明所构建的 sh-*NUPRI* 序列可以有效减少各细胞系 *NUPRI* 的表达。我们再次通过细胞凋亡染色对 *NUPRI* 敲低的 786-O(图 8)及 Caki-1(图 9)细胞系进行了凋亡的表型探索,结果显示,在无阿昔替尼的

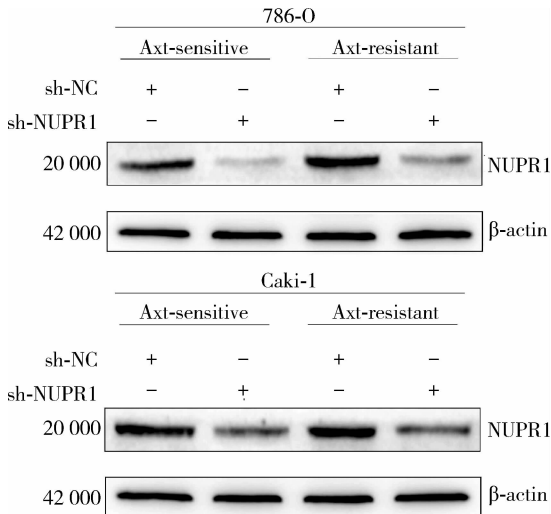
环境下,敲低 *NUPRI* 不会使细胞自发凋亡。在存在阿昔替尼的环境下,敏感细胞系的 *NUPRI* 敲低后与敲低前的凋亡水平差异无统计学意义;耐药细胞系的 *NUPRI* 敲低后相较敲低前的凋亡水平显著上升,并且与被敲低或未被敲低 *NUPRI* 的敏感细胞系之间凋亡水平差异均无统计学意义,结果说明,对阿昔替尼耐药的细胞系在敲低 *NUPRI* 之后恢复了对阿昔替尼的敏感性。



A, RNA expression level of *NUPRI* in axitinib resistant lines was higher than that in sensitive lines (**** $P < 0.0001$); B, protein expression level of *NUPRI* in axitinib resistant lines was higher than that in sensitive lines. *NUPRI*, nuclear protein 1.

图6 不同细胞系 *NUPRI* 的表达水平

Figure 6 Expression level of *NUPRI* in different cell lines



NUPRI was successfully knocked down with sh-*NUPRI* in 786-O and Caki-1 cell lines. NC, negative control; *NUPRI*, nuclear protein 1; Axt, axitinib.

图7 786-O 和 Caki-1 细胞系的 *NUPRI* 敲低验证

Figure 7 *NUPRI* knockdown validation of 786-O and Caki-1 cell lines

2.5 敲低 *NUPRI* 通过调节 *BAX/BCL2*-caspase 3 通路促进阿昔替尼引起的细胞凋亡

为了寻找敲低 *NUPRI* 后使耐药细胞系凋亡水平增加的信号通路,我们选择了凋亡下游的效应蛋白

caspase3 进行了 Western blot 验证(图 10A),结果发现,敲低 *NUPRI* 表达后,阿昔替尼处理后的耐药细胞系前体 caspase3 蛋白(相对分子质量 32 000)表达水平较未敲低 *NUPRI* 的耐药细胞系表达水平下降,剪切体 c-caspase3(相对分子质量 17 000)表达水平上升,说明 caspase3 参与了敲低 *NUPRI* 后使耐药细胞凋亡水平增加的信号通路。我们进而寻找了 caspase3 的上游通路蛋白 *BAX* 与 *BCL2*,进行 Western blot 实验(图 10B),结果发现,起到抑制细胞凋亡作用的 *BCL2*,在阿昔替尼处理后的敏感细胞系以及敲低 *NUPRI* 的耐药细胞系中有所下降,而对细胞凋亡起到促进作用的 *BAX*,在阿昔替尼处理后的敏感细胞系以及敲低 *NUPRI* 的耐药细胞系中均有升高。

这些结果说明,对阿昔替尼耐药的 ccRCC 细胞系通过上调 *NUPRI* 的表达,在阿昔替尼存在的环境中能够减少 *BAX*、增加 *BCL2* 的表达,进而减少 caspase3 剪切体的水平,最终抑制自身的细胞凋亡,形成了对阿昔替尼的耐药性。

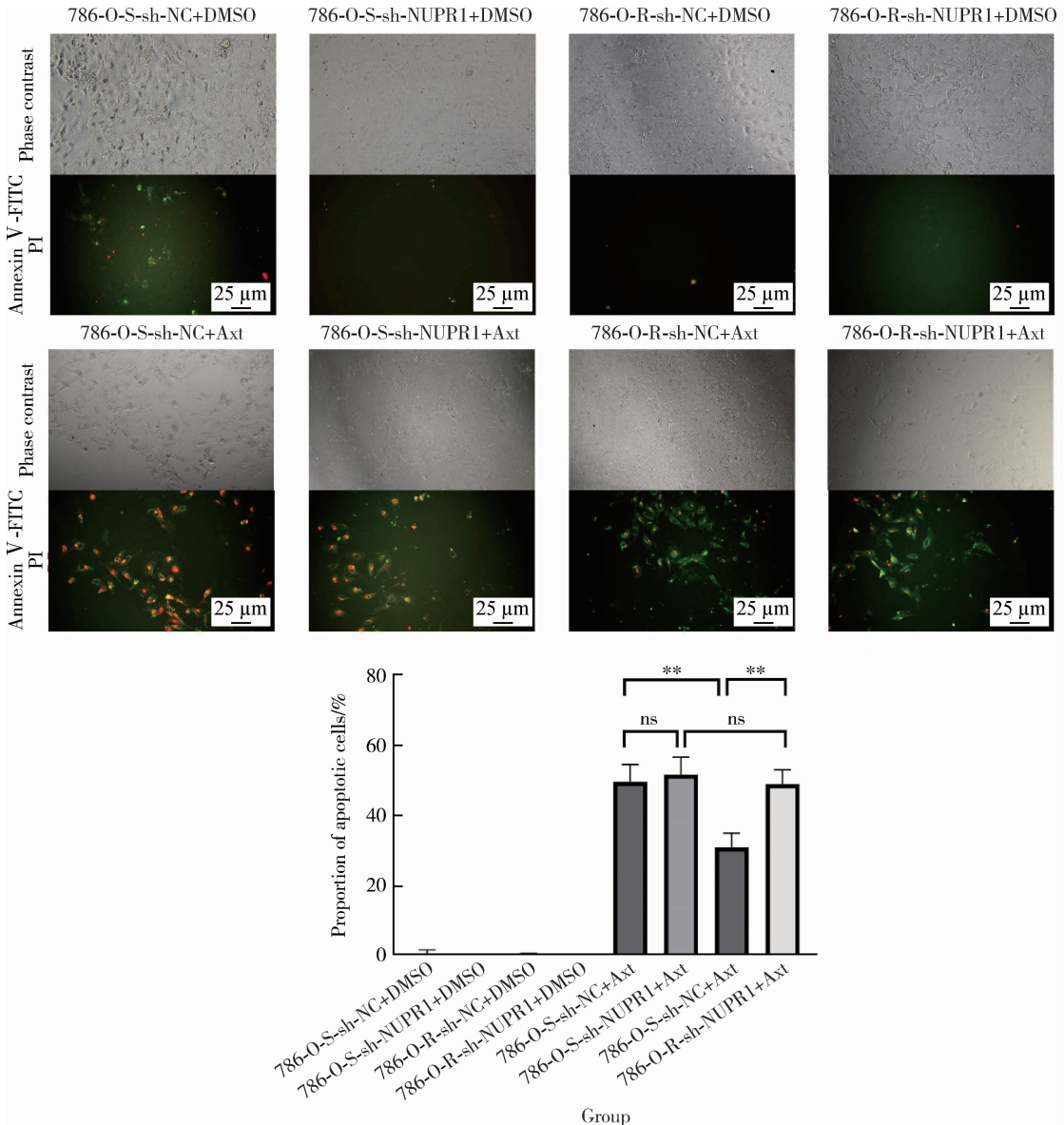
3 讨论

阿昔替尼作为 TKI 是疏水性的小分子,可以很容易地进入细胞内,可以与受体的胞内结构域和胞内信号分子相互作用,因此,能够阻断细胞内各种下游信号通路的激活^[18]。普遍认为,VEGF 类 TKI 是通过作用于供应肿瘤的血管内皮,通过抑制新的血管生成、诱导内皮细胞凋亡起到抑制肿瘤细胞生长的作用^[19]。对于体外的肾癌细胞系,不存在供应肿瘤的血管,但我们的细胞表型实验结果反映出阿昔替尼可以直接抑制体外细胞的增殖能力,并引起细胞凋亡,为阿昔替尼对肿瘤细胞的直接作用提供了证据。实际上,若能明确 TKI 类药物对肿瘤细胞的直接作用机制,便有助于在耐药的细胞中明确这种机制是如何被打断或逆转的,进而针对相应节点设计药物,促进对肿瘤的治疗,但遗憾的是明确 TKI 类药物对肿瘤细胞直接作用机制的研究较少,这或许是具有前景的另一研究方向。

在构建耐药细胞系的过程中,我们发现尽管耐药细胞系可以增殖,但在具有阿昔替尼的培养基环境下难以发现新生细胞的产生,在无药物的培养基中才会出现增殖的细胞,这与其他大部分研究报道的不同,其他大部分研究报道的是对舒尼替尼、索拉非尼耐药的细胞可以在药物存在的环境中增殖^[20],但这并不能说明我们构建的耐药细胞系是失败的,因为细胞对药物的抵抗作用可以反映在增殖能力更强、凋亡水平降低^[21]或者迁移/侵袭能力增强^[22]等

多个方面。在已有的一篇关于 ccRCC 阿昔替尼耐药的研究中^[23],尽管作者在方法里提到他们构建的耐药细胞系是“能够在特定浓度的培养基中稳定生长”的,但是其文内并没有写明耐药细胞能够增长状态下的阿昔替尼的浓度,以及结果中没有对耐药细胞系增殖能力的体现。我们相信其结果的可靠性,可能是作者实验中的阿昔替尼浓度未达到类似

我们实验中 20 $\mu\text{mol/L}$ 的水平。尽管我们对耐药细胞系的阿昔替尼暴露周期反复进行了 1 年余的研究,期间对耐药细胞系持续传代,从未冻存过,但也未能明确发现耐药细胞系在阿昔替尼存在的情况下复制出了新的细胞,但仍期待能够培养出在较高浓度阿昔替尼环境中可以明显增殖的耐药细胞系,以便更好地促进对阿昔替尼耐药细胞机制的理解。



Knocking down *NUPR1* inhibited the anti-apoptosis ability of 786-O-R cell lines. ** $P < 0.01$; ns, no significance. NC, negative control; *NUPR1*, nuclear protein 1; PI, propidium iodide; FITC, fluorescein isothiocyanate; DMSO, dimethyl sulfoxide; Axt, axitinib.

图8 786-O各细胞系的凋亡染色

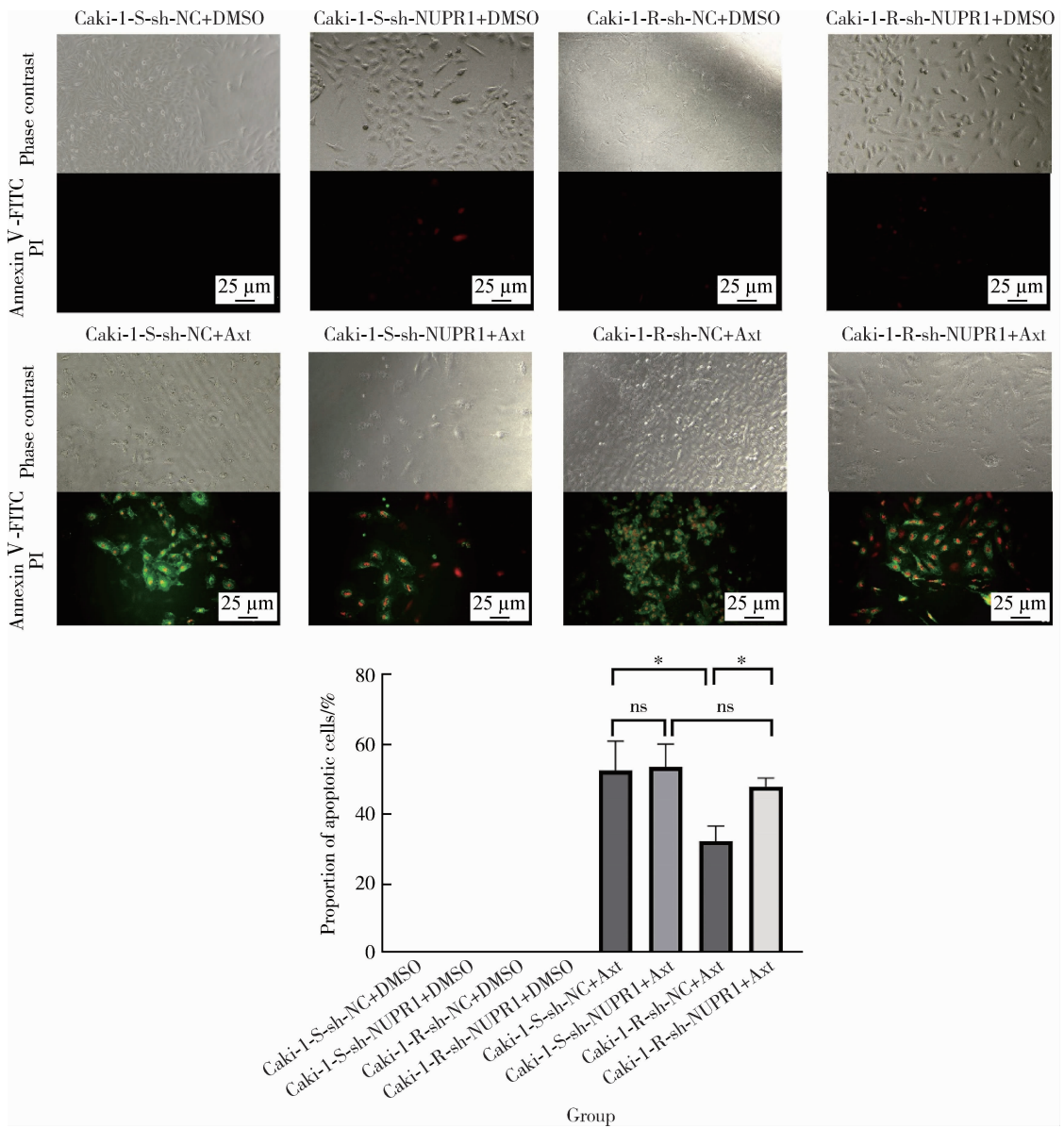
Figure 8 Apoptosis staining results of 786-O cell lines

通过对所构建的耐药细胞系进行转录组测序,我们筛选出了感兴趣的 *NUPR1* 基因。*NUPR1* 基因最初被确定为是一种转录因子,它在急性胰腺炎、胰腺发育和胰腺再生过程中的大鼠的胰腺腺泡细胞中被快速大量诱导^[24]。有研究发现,在肝癌细胞中敲

低 *NUPR1*,可以通过抑制细胞的增殖、迁移、侵袭能力,增强对索拉非尼药物治疗的敏感性^[25]。另一项研究在 ccRCC 细胞系中敲低 *NUPR1*,使得在索拉非尼环境下细胞的凋亡水平上升,对索拉非尼更加敏感,认为 *NUPR1* 是 ccRCC 对索拉非尼体外耐药所

必需的因素^[17]。我们的研究结果同样表明, *NUPRI* 在 ccRCC 细胞对阿昔替尼耐药过程中表达有所上

升,而在耐药细胞系中敲低 *NUPRI*,通过抑制耐药细胞系的抗凋亡能力,恢复了对阿昔替尼的敏感性。



Silencing *NUPRI* inhibited the anti-apoptosis ability of Caki-1-R cell lines. * $P < 0.05$; ns, no significance. NC, negative control; *NUPRI*, nuclear protein 1; PI, propidium iodide; FITC, fluorescein isothiocyanate; DMSO, dimethyl sulfoxide; Axt, axitinib.

图 9 Caki-1 各细胞系的凋亡染色

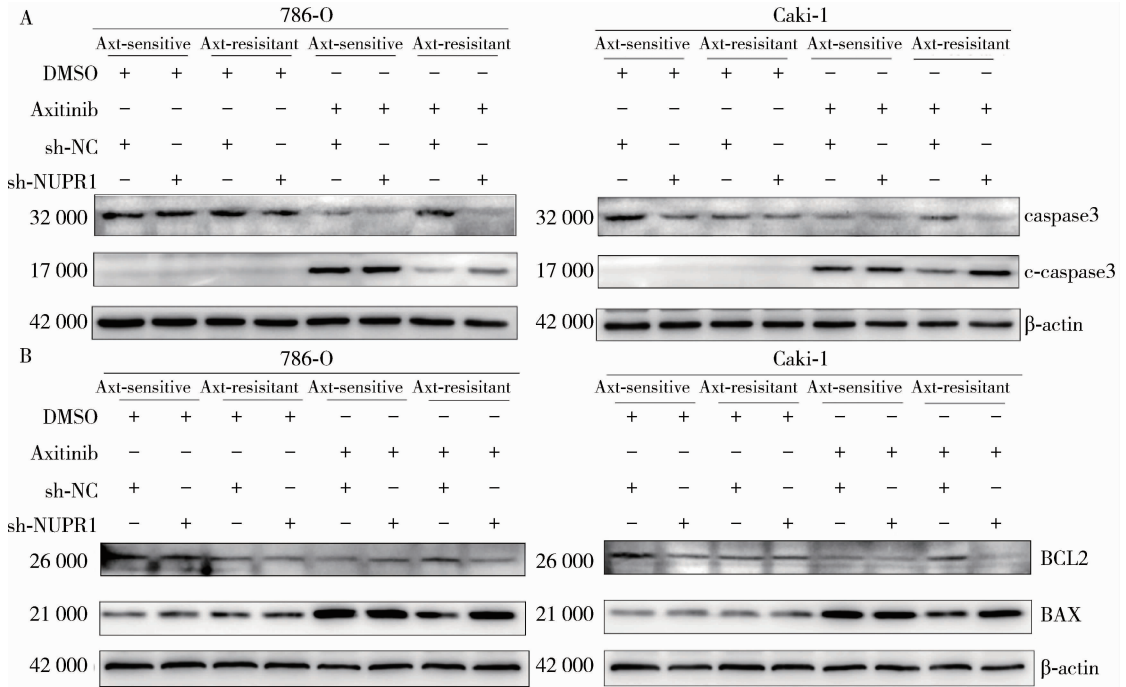
Figure 9 Apoptosis staining results of Caki-1 cell lines

此外, *NUPRI* 是一种应激反应转录因子,被许多生物和化学应激源上调^[26],可以在氧化应激、内质网应激和代谢应激等条件下被转录激活,以保护细胞免受这些应激的影响,而 Santofimia-Castaño 等^[27]发现在胰腺癌小鼠模型中,使 *NUPRI* 失活会导致内质网应激,进而使线粒体功能紊乱,最终导致线粒体途径的细胞凋亡。这些证据表明 *NUPRI* 与应激效应存在互为因果的联系,细胞的内质网应激被未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)所控制,破坏钙离子稳态以及致癌变化和细胞缺氧

等会破坏蛋白质稳态,导致错误折叠的蛋白质在内质网腔中积聚,这被称为内质网应激,内质网应激使细胞激活 UPR 以恢复内质网稳态^[28]。轻度的 UPR 可帮助恢复内质网稳态并促进细胞存活,然而,在严重或无法补救的内质网应激情况下,持续的 UPR 信号可以从适应性反应转变为促凋亡反应,从而诱导细胞死亡^[29]。*BAX/BCL2-caspase3* 是肿瘤细胞凋亡过程中常见的重要调控通路^[30],细胞凋亡由几个蛋白质家族调节,包括上游 *BCL2* 家族(例如抗凋亡的 *BCL2* 和促凋亡的 *BAX*)和下游 caspase 家族(例如

caspase3)。caspase 的激活可以通过不同的机制发生,线粒体介导的细胞凋亡途径,涉及 *BCL2* 家族蛋白通过控制线粒体细胞色素 c 的释放来调节细胞凋亡,最终激活 caspase3 以执行细胞凋亡过程^[31]。在我们的 Hallmark 测序结果中,耐药细胞系较敏感细胞系的 UPR 相关通路水平上升,表明出现了一定程度的内质网应激。本研究的最终结果证明耐药细胞系

NUPRI 的敲低增加了 *BAX/BCL2-caspase3* 这一线粒体途径凋亡通路的水平,认为内质网途径可能作为线粒体途径的上游过程也参与了 ccRCC 细胞系对阿昔替尼的耐药,亦或是肿瘤细胞受到阿昔替尼的刺激后产生 UPR,促使 *NUPRI* 表达上升最终导致肿瘤细胞耐药。*NUPRI* 与内质网应激之间复杂的关系对 ccRCC 细胞系耐药的影响有待于进一步探索。



A, silencing *NUPRI* decreased the protein level of caspase3 and increased the level of cleaved-caspase3 in resistant lines treated with axitinib; B, silencing *NUPRI* decreased the protein level of BCL2 and increased the protein level of BAX in resistant lines treated with axitinib. NC, negative control; *NUPRI*, nuclear protein 1; c-caspase3, cleaved-caspase3; BCL2, B-cell lymphoma-2; BAX, BCL2-associated X protein; DMSO, dimethyl sulfoxide; Axt, axitinib.

图 10 干预 *NUPRI* 对凋亡相关蛋白的调控

Figure 10 Regulation of apoptosis related proteins by interfering *NUPRI*

我们的研究存在不足之处:第一,没有进行动物实验。尽管通过动物模型构建出的耐药细胞系可能一开始会更接近人体真实环境,但最终也会需要离体培养,且需要将细胞反复药物处理维持耐药性,故而从实验设计之初我们便使用细胞实验构建耐药细胞系,而在耐药细胞系构建之后也没有进行在体实验,得到耐药细胞系后所观察到的细胞性质是增殖能力减弱,但抗凋亡能力增强,主要关注耐药细胞的抗凋亡能力,故而未进行皮下成瘤、肺转移模型等细胞增殖、侵袭能力的验证,有待后续实验探索。第二,没有临床耐药样本的测序及蛋白表达水平的验证。阿昔替尼的获得性耐药通常需要 6~12 个月的用药才能产生,而临床上尽管存在阿昔替尼的新辅助治疗用药,但一般用药 3 个月^[8]便进行手术治疗,难以获得耐药的肾癌组织,术后的组织也仅是对阿昔替尼具有一段时间的反应性,并非耐药组织,对测

序的结果难以周密论证与耐药相关,因此,未行临床样本测序,但我们会密切关注在阿昔替尼用药后出现药物抵抗的 ccRCC 患者,在符合伦理审查标准及患者意愿的前提下,进一步对耐药肿瘤组织进行深入研究。

综上所述,本研究报道了 ccRCC 细胞对阿昔替尼耐药后的表型变化,阐明了可能的耐药调控机制,发现 ccRCC 细胞对阿昔替尼耐药诱导后增殖能力下降;*NUPRI* 在对阿昔替尼耐药的 ccRCC 细胞中表达水平上调;通过 *BAX/BCL2-caspase3* 通路降低了阿昔替尼环境中的细胞凋亡水平,导致对阿昔替尼的抵抗作用增强。本研究提供了阿昔替尼直接作用于肿瘤细胞的证据,且初步补充了 ccRCC 对阿昔替尼耐药研究领域的空缺,为 *NUPRI* 抑制剂与 VEGF 类 TKI 联合治疗 ccRCC 提供了理论依据,有望减少 ccRCC 靶向药物治疗耐药的结局,改善患者的预后。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17–48.
- [2] Motzer RJ, Bukowski RM, Figlin RA, et al. Prognostic nomogram for sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma [J]. *Cancer*, 2008, 113(7): 1552–1558.
- [3] Nerich V, Hugues M, Paillard MJ, et al. Clinical impact of targeted therapies in patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2014, 7: 365–374.
- [4] Powles T, Plimack ER, Soulières D, et al. Pembrolizumab plus axitinib *versus* sunitinib monotherapy as first-line treatment of advanced renal cell carcinoma (KEYNOTE-426): Extended follow-up from a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(12): 1563–1573.
- [5] Incorvaia L, Madonia G, Corsini LR, et al. Challenges and advances for the treatment of renal cancer patients with brain metastases: From immunological background to upcoming clinical evidence on immune-checkpoint inhibitors [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021, 163: 103390.
- [6] Shepard DR, Garcia JA. Toxicity associated with the long-term use of targeted therapies in patients with advanced renal cell carcinoma [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009, 9(6): 795–805.
- [7] Rini BI, Escudier B, Tomczak P, et al. Comparative effectiveness of axitinib *versus* sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): A randomised phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2011, 378(9807): 1931–1939.
- [8] Cai W, Cai B, Zhou J, et al. Comparison of efficacy and safety among axitinib, sunitinib, and sorafenib as neoadjuvant therapy for renal cell carcinoma: A retrospective study [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39(1): 56.
- [9] Zhou X, Hou W, Gao L, et al. Synergies of antiangiogenic therapy and immune checkpoint blockade in renal cell carcinoma: From theoretical background to clinical reality [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1321.
- [10] Gulati S, Labaki C, Karachaliou GS, et al. First-line treatments for metastatic clear cell renal cell carcinoma: An ever-enlarging landscape [J]. *Oncologist*, 2022, 27(2): 125–134.
- [11] Choueiri TK, Motzer RJ, Rini BI, et al. Updated efficacy results from the JAVELIN Renal 101 trial: First-line avelumab plus axitinib *versus* sunitinib in patients with advanced renal cell carcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(8): 1030–1039.
- [12] Buchler T, Bortlicek Z, Poprach A, et al. Outcomes for patients with metastatic renal cell carcinoma achieving a complete response on targeted therapy: A registry-based analysis [J]. *Eur Urol*, 2016, 70(3): 469–475.
- [13] Buchler T, Poprach A, Bortlicek Z, et al. Outcomes of patients with long-term treatment response to vascular endothelial growth factor-targeted therapy for metastatic renal cell cancer [J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2017, 15(6): e1047–e1053.
- [14] Lu S, Stein JE, Rimm DL, et al. Comparison of biomarker modalities for predicting response to PD-1/PD-L1 checkpoint blockade: A systematic review and meta-analysis [J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(8): 1195–1204.
- [15] Ballesteros P, Chamorro J, Román-Gil MS, et al. Molecular mechanisms of resistance to immunotherapy and antiangiogenic treatments in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(23): 5981.
- [16] Xiang Y, Zheng G, Zhong J, et al. Advances in renal cell carcinoma drug resistance models [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 870396.
- [17] He W, Cheng F, Zheng B, et al. NUPR1 is a novel potential biomarker and confers resistance to sorafenib in clear cell renal cell carcinoma by increasing stemness and targeting the PTEN/AKT/mTOR pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(10): 14015–14038.
- [18] Gotink KJ, Verheul HM. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: What is their mechanism of action? [J]. *Angiogenesis*, 2010, 13(1): 1–14.
- [19] Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: Mechanisms of anti-tumour activity [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(8): 579–591.
- [20] Chen Y, Lu Z, Qi C, et al. N(6)-methyladenosine-modified TRAF1 promotes sunitinib resistance by regulating apoptosis and angiogenesis in a METTL14-dependent manner in renal cell carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 111.
- [21] Sakai I, Miyake H, Fujisawa M. Acquired resistance to sunitinib human renal cell carcinoma cells is mediated by constitutive activation of signal transduction pathways associated with tumour cell proliferation [J]. *BJU Int*, 2013, 112(2): 211–220.
- [22] Azam F, Mehta S, Harris AL. Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(8): 1323–1332.
- [23] Huang H, Zhang J, Jiang P, et al. FXR1 facilitates axitinib resistance in clear cell renal cell carcinoma *via* regulating KEAP1/Nrf2 signaling pathway [J]. *Anticancer Drugs*, 2023, 34(2): 248–256.
- [24] Mallo GV, Fiedler F, Calvo EL, et al. Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(51): 32360–32369.
- [25] Emma MR, Iovanna JL, Bachvarov D, et al. NUPR1, a new target in liver cancer: implication in controlling cell growth, migration, invasion and sorafenib resistance [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(6): e2269.
- [26] Martin TA, Li AX, Sanders AJ, et al. NUPR1 and its potential role in cancer and pathological conditions [J]. *Int J Oncol*, 2021, 58(5): 21.
- [27] Santofimia-Castaño P, Lan W, Bintz J, et al. Inactivation of NUPR1 promotes cell death by coupling ER-stress responses with necrosis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16999.
- [28] Madden E, Logue SE, Healy SJ, et al. The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance [J]. *Biol Cell*, 2019, 111(1): 1–17.
- [29] Hetz C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(2): 89–102.
- [30] Kowalczyk T, Sitarek P, Skała E, et al. Induction of apoptosis by *in vitro* and *in vivo* plant extracts derived from *Menyanthes trifoliata* L. in human cancer cells [J]. *Cytotechnology*, 2019, 71(1): 165–180.
- [31] Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [J]. *Science*, 1997, 275(5303): 1132–1136.

(2023-03-20 收稿)
(本文编辑:刘淑萍)